

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VYUŽITÍ ^{31}P NMR KE KVANTITATIVNÍ ANALÝZE FOSFOREČNANOVÉHO DIESTERU ŠKROBU A URČENÍ MECHANISMU REAKCE

EVŽEN ŠÁRKA^a, RICHARD HRABAL^b,
JAROSLAV KOLÁČEK^a, PETRA SMRČKOVÁ^a
a ZDENĚK BUBNÍK^a

^a Ústav sacharidů a cereálií, ^b Centrální laboratoře, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
evzen.sarka@vscht.cz

Došlo 5.3.14, přepracováno 31.7.14, přijato 26.9.14.

Klíčová slova: fosforečnanový diester škrobu, rezistentní škrob, pomalu stravitelný škrob, stravitelnost škrobu, chemicky modifikované škroby

Úvod

Škrob patří mezi fyziologicky a hospodářsky nejdůležitější polysacharidy. Ukládá se v zásobních orgánech rostlin ve formě škrobových zrn, která se nerozpouštějí ve studené vodě. Hlavními složkami škrobu jsou dva α -D-glukany – lineární amylosa s α -(1→4) glykosidovými vazbami a větvený amylopektin, obsahující α -(1→4) a α -(1→6) vazby, kromě toho škrobová zrna obsahují i menší množství dalších složek, např. lipidy a proteiny.

Fosfor se v nativním škrobu vyskytuje jako fosfátový monoester (především u hlízových škrobů), ve fosfolipidech (především u cereálních škrobů) a ve formě anorganických fosforečnanů. Fyzikálně-chemické vlastnosti nativních škrobů lze modifikovat zesíťováním, při kterém jsou doplněny intra- a intermolekulární vazby v náhodných místech škrobového zrna¹. Po tomto zpracování produkt kromě již uvedených forem fosforu dále obsahuje zesíťovací vazby mezi molekulami škrobu

(chemická struktura viz²), zbytky reakčního činidla a anorganické fosfáty vedlejšího reakčního produktu.

Fosforečnanový diester škrobu (v anglosaské literatuře označovaný jako distarch phosphate; DSP) je zesíťovaný škrob. Derivát s nízkým stupněm substituce se běžně využívá jako zahušťovadlo nebo stabilizátor, např. v masových konzervách, paštikách, masových směsích, majonézách, náplních či v marmeládách. Jednoduchými laboratorními metodami nelze odlišit obsah fosforu v zesíťujících vazbách od fosforu v monofosfátových skupinách či od anorganického fosforu, evropští výrobci proto hodnotu stupně substituce DSP neudávají a hodnotí jej na základě uživatelské kvality, tedy především viskozitou vzniklé disperze.

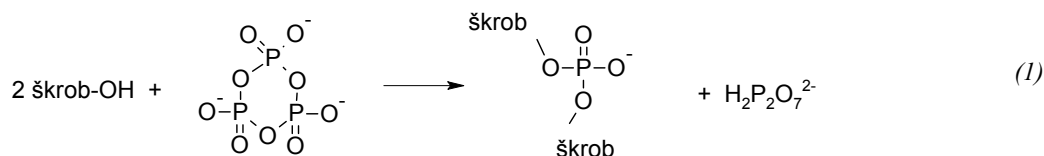
Vysocezesíťené škroby mají vyšší teplotu mazovatení než škroby nativní, tyto látky procházejí tepelným procesem beze změny ve formě škrobových zrn^{3,4}, tedy vykazují naopak nižší viskozitu. Nové uplatnění fosforečnanového diesteru se očekává ve formě tepelně odolného rezistentního škrobu, např. v podobě výživového doplňku. Tento rezistentní škrob (zařazený do skupiny RS4, cit.⁵) není rozštěpen enzymy v tenkém střevu, ale přechází až do tlustého střeva. Rezistentní škrob má podobnou funkci jako vláknina, do které bývá i zařazován. V tlustém střevu však může být střevní mikroflórou metabolizován na sekundární produkty.

Při výrobě DSP se používá jako reakční činidlo trime-ta-fosforečnan sodný podle následujícího schématu (1).

Reakční mechanismus však dosud není příliš prozkoumán⁶.

Klasická metoda stanovení celkového obsahu fosforu podle Smithe and Carusa⁷ je založena na mineralizaci, přidavku roztoku molybdenanu amonného a vanadičnanu amonného a měření absorbance při 460 nm. Koch a spol.³ stanovovali obsah fosforu v nízkoesíťených škrobech potenciometrickou metodou, což umožňovalo vyhodnotit odděleně monoester škrobu a DSP. Tato metoda však není použitelná pro vyšší obsah fosforu a může působit problémy při rozbořech bramborového škrobu s vysokým obsahem monofosfátových skupin.

^{31}P NMR spektroskopie umožňuje současně vedle sebe vyhodnotit jednotlivé formy fosforu⁸. Protože vysocezesíťený DSP vlivem vysoké molární hmotnosti není rozpustný (ani ve vodě, ani v dimethylsulfoxidu), je třeba před vlastním stanovením provést mírnou hydrolýzu škrobových molekul. Vzhledem k tomu, že jde o specifické



enzymové štěpení vazby α -D(1→4), nedochází k porušení fosfátových vazeb⁸.

Kvantitativní analýzu je možné provést dvojím způsobem – buď použitím vnitřního standardu, nebo proměřením celkové hodnoty obsahu fosforu kolorimetricky a vyhodnocením ploch NMR signálů. V našem případě byl použit druhý postup.

Cílem práce bylo: (1) charakterizovat formy a hodnoty obsahu fosforu v komerčních nízkozesítených škrobech (bramborovém, kukuřičném), (2) totéž pro laboratorně připravený pšeničný škrob s vyšším stupněm zesítení a (3) zhodnotit mechanismus reakce vzniku DSP.

Materiál a metody

Materiál

Nativní škroby pocházely od výrobců Amylon, a.s. Havlíčkův Brod a Škrobáren Pelhřimov a.s. DSP na bázi bramborového škrobu byl poskytnut Škrobárnami Pelhřimov a Krnovskou škrobárnou s.r.o., DSP na bázi kukuřičného škrobu byl poskytnut rakouskou firmou Agrana (č. 20.350). Trimetafosfát sodný (STMP), kyselina fosforečná, deuterium oxid (D₂O), hydroxid sodný (NaOD), deuterovaný DMSO a EDTA byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, s.r.o., Praha. Tripolyfosfát sodný by pořízen od firmy Fichema, Moravany. Pankreatická α -amylasa (Pancreatin, 3 Ceralpha Units/mg) a amyloglukosidasa (3300 Units/ml) byly nakoupeny od firmy NOAK ČR s.r.o., Praha.

Laboratorní příprava vysocezesíteného pšeničného škrobu

Byl použit postup uvedený v cit.⁹. Odběr vzorků byl proveden vždy po 60 min, což umožnilo vyhodnotit průběh reakce. Vzorek byl promyt a vysušen při 40 °C.

Analýza pomocí kolorimetrické reakce a ³¹P NMR

Před stanovením obsahu fosforu byl škrob vysušen při 130 °C po dobu 90 min. Obsah fosforu byl stanoven spektrofotometricky s vanado-molybdenovým činidlem¹⁰, po

předchozím zmineralizování vzorků škrobu v prostředí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku.

Aby byla zajištěna rozpustnost pro NMR, byly škroby hydrolyzovány na menší molekuly podle postupu uvedeného v cit.⁸ s drobnou modifikací v závěrečné fázi. Roztok fosfodextrinů (5%, 2 ml) byl smíchán s 2 ml roztoku EDTA v D₂O o koncentraci 20 mmol l⁻¹, pH bylo upraveno na 8,0 pomocí 1M NaOD a pro zajištění čírosti roztoku bylo přidáno 0,05 ml DMSO.

³¹P NMR spektra byla nasnímaná na přístroji Bruker Avance^{III} 500 MHz vybaveném 5mm měřicí sondou (BBO). Spektra byla snímána při pracovní frekvenci 202,46 MHz a teplotě 25 °C. Případné štěpení signálů interakcemi s ¹H bylo odstraněno širokopásmovým dekaplingem. Každé spektrum bylo nasnímané 10 000 průchody (skeny) s čekací dobou mezi skeny 5 s a zpracováno s 1Hz rozšířením čáry. Celkový měřicí čas byl tedy 15 hodin, což bylo maximum, aniž by došlo k destrukci vzorku. Chemické posuny byly vztaženy k signálu kyseliny fosforečné (0 ppm). Přiřazení jednotlivých rezonancí bylo provedeno na základě publikovaných údajů. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno vzájemným porovnáním integrálních intenzit příslušných signálů.

Výsledky a diskuse

Analýza nízkozesítených škrobů

Obsah fosforu v analyzovaných škrobech udává tab. I, u bramborového škrobu měl hodnotu 850 mg kg⁻¹ suš. Podobné údaje (575–1090 mg kg⁻¹) publikovali Noda a spol.¹¹, Kim a spol.¹² a Šimková a spol.¹³. Tab. II, obr. 1 a 2 prezentují poměr jednotlivých forem škrobu, zesítení nebylo prokázáno, protože stupeň substituce (DS) charakterizující zesítení uvádějí Koch a spol.³ u komerčních škrobů hodnotou 1·10⁻⁴, což odpovídá obsahu fosforu 0,002 % suš., tedy pod mezí stanovitelnosti.

Stupeň substituce monofosfátovými skupinami byl vypočten podle rovnice³ (2):

$$DS_{\text{mono}} = \frac{162 \cdot x_{\text{mono}}}{3100 - 124 \cdot x_{\text{mono}}} \quad (2)$$

kde x_{mono} (hm.%) je obsah fosforu v monofosfátových vazbách. Nejnižší DS_{mono} byl zjištěn u kukuřičného modifikova-

Tabulka I

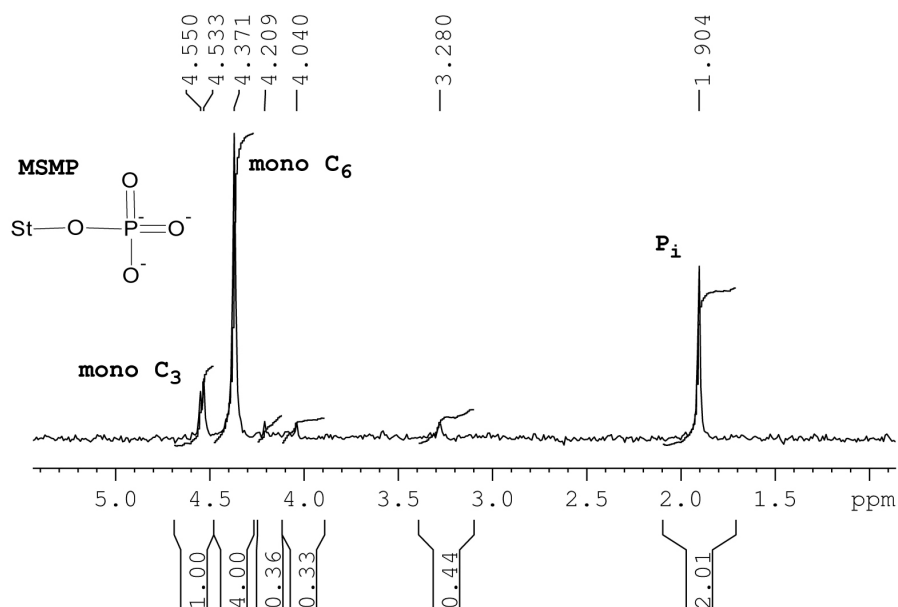
Celkový obsah fosforu v bramborovém škrobu a nízkozesítených škrobech

Vzorek	Charakteristika škrobu	Sušina [%]	Obsah fosforu [g kg ⁻¹ suš.]
–	bramborový škrob	89,05	0,85
Moramyl ZBH	zesíťovaný fosfát škrobu	85,87	0,98
Solvarin DBV	zesíťovaný fosfát škrobu	84,68	0,77
Moramyl ZB	tepelně modifikovaný zesíťovaný fosfát škrobu	89,24	2,50
Agenajel 20.350	zesíťovaný fosfát waxy škrobu	87,39	0,15

Tabulka II

Podíl jednotlivých forem fosforu v bramborovém škrobu a nízkozesítěných škrobech

Vzorek	Obsah fosforu [g kg ⁻¹ suš.]					Σ anorg. P	DS-mono ^e
	MSMP ^a	Pi ^b	P-Pi ^c	DSP	STMP ^d		
Bramborový škrob	0,62	0,23	0	0	0	0,23	3,24·10 ⁻³
Moramyl ZBH	0,75	0,14	0,04	0	0,05	0,23	3,96·10 ⁻³
Solvarin DBV	0,61	0,13	0,03	0	0	0,16	3,19·10 ⁻³
Moramyl ZB	1,04	0,94	0,37	0	0,15	1,46	5,44·10 ⁻³
Agenajel 20.350	0,04	0,08	0,02	0	0,01	0,11	2,05·10 ⁻⁴

^a MSMP – monofosfát škrobu, ^b Pi – anorganický fosfát, ^c P-Pi – pyrofosfát, ^d STMP – trimetafosforečnan sodný,^e DS-mono – stupeň substituce monofosfátových vazebObr. 1. ³¹P NMR spektrum nativního bramborového škrobu, význam symbolů viz tab. II

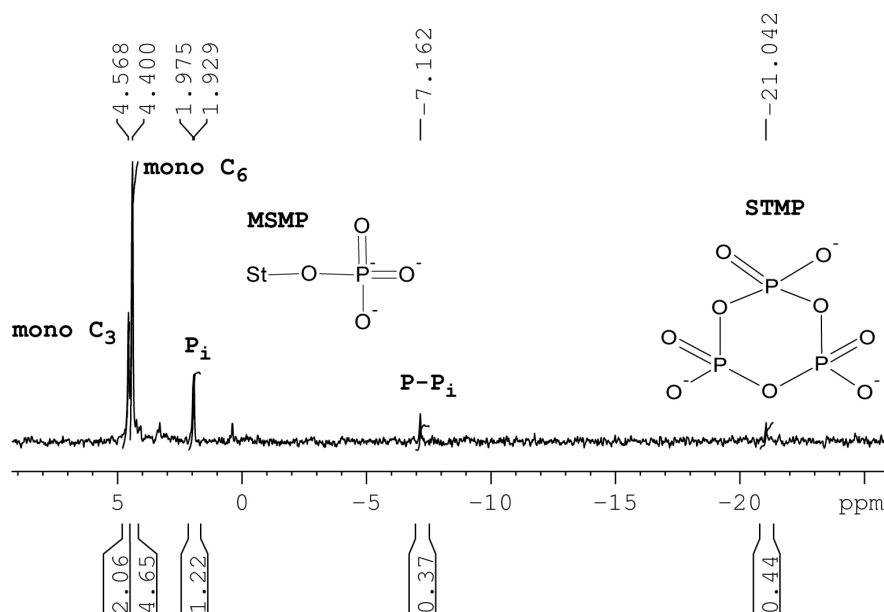
vaného škrobu, nejvyšší u tepelně modifikovaného zesítěného bramborového škrobu. U ostatních škrobů byl prakticky zachován obsah monofosfátových skupin původního nativního bramborového škrobu (na uhlících C₃ a C₆).

Vyhláška 235/2010 Sb. předepisuje zbytkové fosforečnany hodnotou 5 g kg⁻¹, resp. 4 g kg⁻¹ u kukuřičného škrobu (vyjádřené jako fosfor). Jak obsah trimetafosforečnanu sodného, který je reakčním činidlem, tak celkový obsah všech (anorganických) fosforečnanů u modifikovaného škrobu tuto hodnotu splňoval.

Analýza zesítěného škrobu s vyšším stupněm substituce

Celkový obsah fosforu a poměr v analyzovaných škrobech udává tab. III. Nebyly identifikovány klasické monofosfátové skupiny, typické např. pro bramborový škrob. V první etapě reakce vznikl cyklický monofosfát (obr. 3), který postupně přecházel na DSP.

Cyklický monofosfát je tedy pravděpodobně reakčním meziproduktem při zesíťování. Stupeň substituce se vypočte³:

Obr. 2. ^{31}P NMR spektrum nízkozesítěného škrobu Moramyl ZBH, význam symbolů viz tab. II

$$DS_{\text{C-mono}} = \frac{162 \cdot x_{\text{mono}}}{3100 - 124 \cdot x_{\text{C-mono}} - 84 \cdot x_{\text{di}}} \quad (3)$$

$$DS_{\text{di}} = \frac{162 \cdot x_{\text{di}}}{3100 - 124 \cdot x_{\text{C-mono}} - 84 \cdot x_{\text{di}}} \quad (4)$$

Zjištěný stupeň substituce (zesítěnění) narůstal od $1,29 \cdot 10^{-3}$ (1 h reakce) až po $2,18 \cdot 10^{-3}$ (4 h reakce). Na rozdíl od výsledků Manoi & Rizvia⁸ získaných z derivátů připravených reaktivní superkritickou fluidní extruzí naše vzorky neobsahovaly významnější množství monofosfáto-

vých skupin, trifosforečnan sodný a škrobový difosfát.

Dosažení velmi vysokých hodnot DS ($0,035 \div 0,12$) by vyžadovalo teplotu reakce přes 120°C (cit.¹⁴), což na druhé straně způsobí dekompozici škrobových zrn.

Porovnáme-li naše výsledky s (cit.³), je zřejmé, že námi zjištěný stupeň substituce u těchto škrobů povede k velmi nízkým viskozitám disperzí, neboli teplota mazování bude přesahovat 100°C .

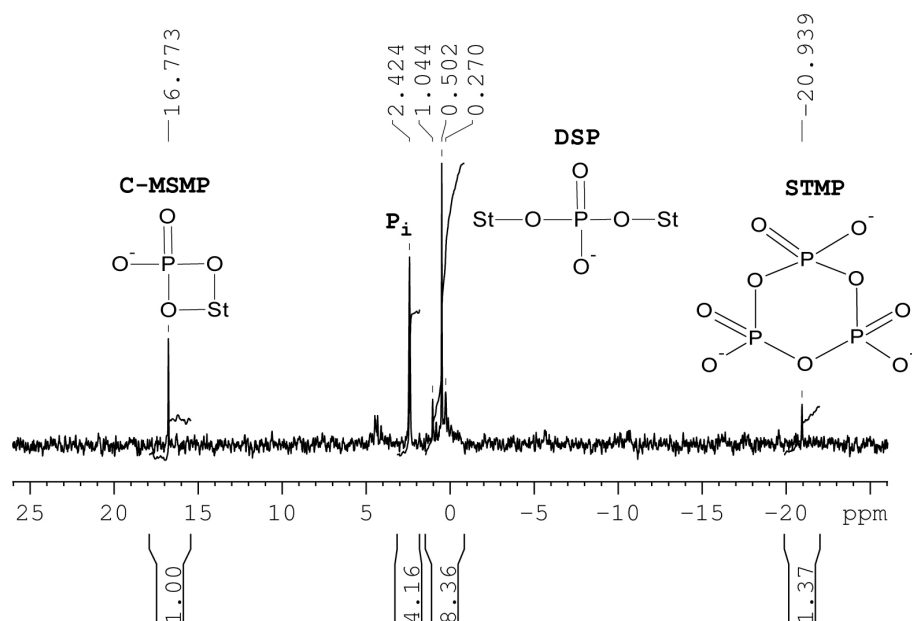
Obsah anorganických fosforečnanů byl určen ve všech případech pod hodnotou 0,5 %, povolenou pro zbytkový obsah fosforu v modifikovaném obilném škrobu.

Tabulka III

Celkový obsah fosforu a podíl jednotlivých forem fosforu ve vzniklém laboratorním produktu

Vzorek	Sušina [%]	Obsah fosforu [g kg ⁻¹ suš.]						DS-mono ^d	DS-di ^e
		celkem	Pi ^a	C-MSMP ^b	DSP	STMP ^c	anorg. P		
VS1	89,89	0,58	0,23	0,08	0,24	0,03	0,26	$3,98 \cdot 10^{-4}$	$1,29 \cdot 10^{-3}$
VS2	88,45	0,72	0,31	0,10	0,26	0,05	0,36	$5,25 \cdot 10^{-4}$	$1,35 \cdot 10^{-3}$
VS3	89,58	0,80	0,36	0,00	0,33	0,11	0,47	0	$1,73 \cdot 10^{-3}$
VS4	89,42	0,76	0,34	0,00	0,42	0,00	0,34	0	$2,18 \cdot 10^{-3}$

^a Pi – anorganický fosfát, ^b C-MSMP – cyklický monofosfát škrobu, ^c STMP – trimetaphosforečnan sodný, ^d DS-mono – stupeň substituce monofosfátových vazeb, ^e DS-di – stupeň substituce zesítujících vazeb



Obr. 3. ^{31}P NMR spektrum vysocezesítěného škrobu (po 2 h reakce), význam symbolů viz tab. III

Diskuse přesnosti stanovení obsahu jednotlivých forem fosforu ve škrobu pomocí ^{31}P NMR spektroskopie

Hlavním faktorem, který má vliv na přesnost stanovení jednotlivých složek škrobu, je kvalita spektra, resp. odstup signálu od šumu (SINO). Kvalita spekter jednotlivých vzorků se poměrně dost lišila právě v odstupu signálu od šumu (SINO = 3–40). Integrace takto zašuměných spekter s sebou nese i poměrně velkou nepřesnost. V literatuře se pro ^{31}P kvantitativní NMR spektra udává přesnost 1,5–2 % při dodržení všech požadovaných parametrů, zejména odstupu signálu od šumu $\text{S/N} > 50$. Vzhledem k tomu, že většina signálů byla pod hranicí, chyba měření bude vyšší. Korektní odhad chyby měření by byl možný na základě určitého statistického souboru dat (minimálně tři opakovaná měření), což však v našem případě nebylo možné z důvodů omezené stability vzorků. Hrubým odhadem se chyba může pohybovat v rozmezí 2–10 % (cit.^{15,16}), což lze považovat za přijatelné, vzhledem ke skutečnosti, že jiná metoda kvantitativního stanovení většiny složek fosforovaných škrobů není v současnosti k dispozici.

Mimo to podle Manoi a Rizvi⁸ mohou chybu při stanovení stupně substituce fosfátové diesterové vazby způsobit u pšeničného škrobu i přítomné fosfolipidy, které vykazují pás rovněž v oblasti $-1 \div 1$ ppm.

Závěr

Metoda ^{31}P NMR prokázala schopnost rozlišení jednotlivých forem fosforu, což umožnilo sledovat kontaminaci vzorků anorganickými fosforečnany, která u nízkozesítěných komerčních produktů činila 21–73 % fosforu. U těchto derivátů však metoda nevykazovala dostatečnou citlivost pro stanovení stupně zesítěnění. U laboratorně připravených vysocezesítěných škrobů v průběhu reakce DS narůstal od $1,29 \cdot 10^{-3}$ (1 h reakce) až po $2,18 \cdot 10^{-3}$ (4 h reakce). Byl identifikován reakční meziprodukt – cyklický monofosfát.

Tento přehledný článek byl zpracován v rámci řešení projektu výzkumu a vývoje MZe QJ1310219 „Pšenice se specifickým složením a vlastnostmi škrobu pro potravinářské a průmyslové účely.“

LITERATURA

1. Singh J., Kaur L., McCarthy O. J.: Food Hydrocolloids 21, 1 (2007).
2. Šárka E., Smrčková P., Seilerová L.: Chem. Listy 107, 929 (2013).
3. Koch H., Bommer H. D., Koppers J.: Strach/Stärke 34, 16 (1982).
4. Daniel J. R., Whistler R. L., Röper H., v knize: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, kap.

- Starch. Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2002, elektronická verze: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a25_001/abstract
5. Jane J.-L., Jiang H., Hasjim J.: *Proc. 6th Int. Conference on Polysaccharides-Glycoscience, Praha, 29.9.-1.10.2010* (Řápková R., Čopíková J., Šárka E., ed.), Czech Chemical Society, Prague, str. 9.
 6. Sang Y., Prakash O., Seib P. A.: *Carb. Polym.* 67, 201 (2007).
 7. Smith R. J., Caruso J., v knize *Methods in Carbohydrate Chemistry* (BeMiller J. N., Whistler R. L., Wolfson M. L., Smith R. J., ed.), sv. IV, kap. 12. Academic Press, New York 1964.
 8. Manoi K., Rizvi S. S. H.: *Carb. Polym.* 81, 687 (2010).
 9. Sang Y., Seib P. A., Herrera A. I., Prakash O., Shi Y.-C.: *Food Chem.* 118, 323 (2010).
 10. Zbíral J. (ed.): *Analýza rostlinného materiálu. Jednotné pracovní postupy*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 2005.
 11. Noda T., Tsuda S., Mori M., Takigawa S., Matsuura-Endo C., Kim S., Hashimoto N., Yamauchi H.: *Food Chem.* 95, 632 (2006).
 12. Kim Y. S., Wiessenborn D. P., Orr P. H., Grant L. A.: *J. Food Sci.* 60, 1060 (1995).
 13. Šimková D., Lachman J., Hamouz K., Vokál B.: *Food Chem.* 141, 3872 (2013).
 14. Lin Q., Xiao H., Zhao J., Li L., Yu F.: *Starch/Stärke* 61, 709 (2009).
 15. Malz F., Jancke H.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 813 (2005).
 16. Maniara G., Rajamoorthi K., Rajan S., Stockton G.W.: *Anal. Chem.* 70, 4921 (1998).

E. Šárka^a, R. Hrabal^b, J. Koláček^a, P. Smrčková^a, and Z. Bubník^a (^a Department of Carbohydrates and Cereals, ^b Central Laboratories, University of Chemistry and Technology, Prague): **The Use of ³¹P NMR for Quantitative Analysis of Distarch Phosphate and Determination of the Reaction Mechanism**

Distarch phosphates of different degree of substitution were analysed by ³¹P NMR. A major part of P was inorganic. When analysing reaction products of wheat starch in laboratory, cyclic monophosphate as a reaction intermediate was found. The chosen procedure made it possible to reach the DS 0.002.

Odborná skupina termické analýzy České společnosti chemické

pořádá

TERMOANALYTICKÝ SEMINÁŘ

18. červen 2015

Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

www.thermal-analysis.cz

TAS 2015

TERMOANALYTICKÝ SEMINÁŘ

18. ČERVEN 2015
PARDUBICE

Cílem semináře je umožnit studentům, mladým i zkušeným vědcům výměnu poznatků a zkušeností s využíváním termooanalytických technik v různých oblastech výzkumu. Příspěvky bude možné na semináři prezentovat formou krátkých přednášek nebo posterů. Všechny prezentované příspěvky budou uveřejněny ve sborníku s ISBN.

Závazné přihlášky: 30. duben 2015

Plné texty příspěvků: 15. květen 2015

Konferenční poplatky:

1000,- Kč (studenti: 500,- Kč)

Kontakt: petra.sulcova@upce.cz

Další informace: www.thermal-analysis.cz